

Membrangebundene Mitochondrienenzyme

Von R. KRAMAR

Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Universität Wien

(Eingegangen am 10. Mai 1971)

Ein großer Teil der Mitochondrienenzyme ist an die Membranen gebunden. Speziell die innere Mitochondrienmembran ist ein hochgeordnetes Multienzymsystem, dessen Architektur noch nicht vollständig geklärt ist.

Eine Reihe von Enzymen, besonders die sog. Atmungsketten-Dehydrogenasen, ist außerordentlich fest mit der Membranstruktur verbunden und bildet einen integralen Teil derselben. Zur Auflösung der Membran in submitochondriale Partikel bzw. zur Solubilisierung der Enzyme sind daher besondere Methoden erforderlich. Weniger tiefgreifende Desintegration der Mitochondrien kann zur Isolierung der Membranen und damit zur Lokalisierung der Enzyme verwendet werden: Für die meisten Mitochondrienenzyme bestehen heute gut begründete Vorstellungen über ihre Lokalisation in den einzelnen Kompartimenten.

Solubilisierung und medizinisch-diagnostische Bedeutung dieser fest gebundenen Enzyme werden diskutiert und anhand spezieller Beispiele erläutert.

Membrane-bound mitochondrial enzymes

A large proportion of the mitochondrial enzymes is bound to the membrane. The inner mitochondrial membrane in particular is a highly ordered multienzyme system whose architecture is not yet fully explained.

Several enzymes, especially the respiratory chain dehydrogenases, are bound extraordinarily firmly to the membrane structure, of which they form an integral part. Special methods are therefore required for the breakdown of the membrane into submitochondrial particles or for the solubilisation of the enzymes. Less destructive methods can be used for the disintegration of the mitochondria, followed by isolation of the membranes and localisation of the enzymes. The site of localisation of most mitochondrial enzymes within the separate compartments of the mitochondrion is now known.

The solubilisation and the significance of these firmly bound enzymes in medical diagnosis is discussed and illustrated by special examples.

Die Bestimmung der Aktivität von Mitochondrien-enzymen findet in der klinischen Chemie ausgedehnte Verwendung; die Auswahl der untersuchten Enzyme beschränkte sich aber bis jetzt fast ausschließlich auf lösliche Enzyme der Matrix, die in das Blut übertreten können. Die fest in den Mitochondrienmembranen verankerten Enzyme sind erst in letzter Zeit interessant geworden: Aktivitätsbestimmungen in Geweben und Gewebefractionen werden in zunehmendem Maße für diagnostische Zwecke durchgeführt. Wenn auch unsere Kenntnis von den Veränderungen dieser fest gebundenen Enzyme unter experimentellen und pathologischen Bedingungen sehr gering ist, so kann doch erwartet werden, daß ihre Bestimmung neue diagnostische Hinweise liefern wird.

Voraussetzung für die Messung derartiger Enzymaktivitäten ist eine genaue Kenntnis der Eigenschaften dieser Enzyme und der Bedingungen, die zu ihrer Ablösung von der Membran führen.

Die einschlägige Literatur ist bisher noch nicht in Hinblick auf klinisch-chemische Belange zusammengestellt worden. Die vorliegende Übersicht befaßt sich daher unter Berücksichtigung eigener Befunde mit allgemein biochemischen und praktischen Aspekten dieser Gruppe von Enzymen.

Mitochondrien als Membranstrukturen

Mitochondrien bauen sich aus einer äußeren und einer inneren Membran auf. Die innere Membran ist gefaltet und erzeugt auf diese Weise Cristae mitochondriales. So entstehen 4 Hauptkompartimente, in denen Enzyme lokalisiert sind:

1. die äußere Membran,
2. der Intermembranraum (Intracristalraum),
3. die innere Membran,
4. die Matrix.

Der geordnete Einbau von Enzymen in die Membranstruktur im Sinne eines Multienzymsystems und die relative Abgeschlossenheit der Enzymsysteme in den einzelnen Kompartimenten begründet die Kontrolle und Kanalisierung des chemischen Geschehens. Molekularbiologie und Morphologie der Membran sind die Schlüssel zum Verständnis komplizierter Reaktionsabläufe, wie u. a. der oxydativen Phosphorylierung.

Andererseits entstehen Probleme für die praktische Enzymologie: Selbst, wenn es fallweise gelingt, durch Standardprozeduren definierte Enzyme oder Enzymkomplexe von der Membran abzulösen, bleibt es schwierig, zu beurteilen, ob es sich dabei um das native Enzym handelt: Herausbrechen aus der Membran bedeutet Ab-

bruch von Bindungen und Verlust der stabilisierenden Membraneinheit. Solche Präparationen sind in mancher Hinsicht interessant: Man kann aus ihnen Multienzymkomplexe rekonstruieren und so zusätzlichen Einblick in deren Aufbau und Funktionsweise gewinnen.

Aufbau der Mitochondrienmembran

Membranmodelle

Die Art der Verankerung der membrangebundenen Enzyme —, und damit die Bedingungen, die für ihre Ablösung erforderlich sind —, hängt eng mit der Struktur der Mitochondrienmembran zusammen. Die Kontroverse über diese ist aber bis heute nicht beendet. Es sollen daher zunächst einige Modelle, die für die Mitochondrienmembran in Erwägung gezogen wurden, betrachtet werden.

1. Das erste Modell, das Protein und Lipid berücksichtigt, stammt von DANIELLI und DAVSON (1) und wurde von ROBERTSON (2) als Einheitsmembran-Modell verallgemeinert. Die Phospholipide liegen hier als molekulare Doppelschicht mit ihren geladenen Gruppen nach außen zwischen zwei Proteinschichten. Die Bindungskräfte bestehen in einer Ionen-Wechselwirkung zwischen den geladenen Gruppen der Lipide und der Proteine. Das Modell ist zwar bestechend einfach, jedoch nicht imstande, die meist sehr feste Verankerung der Membranproteine und ihr Solubilisierungsverhalten zu erklären. Wie die unten folgende Betrachtung zeigt, sind die Kräfte, die Enzyme an eine Membran binden, gerade nicht salzartig oder wenigstens nicht zum überwiegenden Teil, wenn man von wenigen Ausnahmen absieht. Auch die Tatsache, daß man aus Mitochondrien einen Großteil der Phospholipide ohne eine wesentliche Strukturänderung der inneren Membran extrahieren kann (3, 4), spricht gegen die Gültigkeit des DANIELLI-Modells für die innere Mitochondrienmembran.

2. Ein Modell, das die Wechselwirkung zwischen den apolaren Anteilen von Lipid und Protein in den Vordergrund stellt, wurde von BENSON (5) vorgeschlagen. Hier wird die Grundstruktur der Membran in ihrer ganzen Dicke vom Protein gebildet. Das Lipid lagert sich in diese Grundstruktur durch apolare Wechselwirkung ein, so daß seine polaren Gruppen zum Teil an die beiden Oberflächen der Membran gelangen können, also gewissermaßen die Proteinschicht des DANIELLI-Modells durchbrechen. Für unsere Betrachtung liegt der große Vorteil dieses Modells darin, daß es die Wichtigkeit der apolaren Protein-Lipid-Wechselwirkung betont und somit prinzipiell eine Erklärung für die Enzym-solubilisierende Wirkung von Phospholipase anbietet: Die Entfernung eines langkettigen Acylrests aus dem Phospholipidverband schwächt die apolare Wechselwirkung und leitet die Ablösung des Enzyms ein.

3. Die Schule GREENS hat eine extreme Weiterbildung des BENSON-Modells entwickelt, die sich speziell für die innere Membran eignet. Auch nach diesem Modell herrscht eine innige Wechselwirkung zwischen Lipid und Protein, aber es bilden sich kugelförmige Aggregate.

Die Membran wird durch Aneinanderreihung solcher kugelförmiger, stöchiometrisch definierter Lipoproteidkomplexe entstanden gedacht. Das Membrankontinuum ist durchbrochen (6, 7).

Bestechend an dieser Vorstellung ist, daß sie zwanglos eine Verbindung zwischen der hohen Spezifität und dem geordneten Zusammenwirken der Reaktionen der Endoxydation und ihrer strukturellen Organisation herstellt. Der funktionellen Ordnung in der Atmungskette, repräsentiert durch die 4 Enzymkomplexe NADH-Ubichinonreductase (Komplex I), Succinat-Ubichinonreductase (Komplex II), Ubichinon-Cytochrom c-Reductase (Komplex III) und Cytochromoxydase (Komplex IV) entsprechen isolierbare Lipoproteinkomplexe. Wesentlicher Schritt der Isolierung ist die Behandlung mit Cholat und (oder) Desoxycholat und Salzen (8–13).

Freilich ist damit nicht bewiesen, daß diese Lipoprotein-Untereinheiten wirklich in der Membran präformiert sind, da die Bildung von Artefakten durch das Detergens nicht von der Hand gewiesen werden kann. Immerhin dürften aber schon in der nativen Membran sehr spezifische Wechselwirkungen auftreten, die durch ein kontinuierliches Membranmodell nicht zum Ausdruck gebracht werden.

Im Gegensatz zu diesen Verhältnissen bei der Mitochondrienmembran kann man wahrscheinlich bei anderen Membranen, insbesondere bei Plasmamembranen, den Aufbau aus definierten Lipoprotein-Bausteinen ausschließen: Hier kommt es durch Detergenseinwirkung leicht zur Dissoziation in Membranproteine und Phospholipide (14), wie sie bei Mitochondrienmembranen nur schwierig und nicht in diesem Ausmaß erzielt werden kann.

Rekonstitutionsexperimente mit den isolierten Komplexen der Atmungskette haben gezeigt, daß es möglich ist, alle Komplexe zu einer funktionierenden Einheit des Elektronentransports zusammenzufügen (15–17) oder auch nur zwei oder drei miteinander zu vereinigen, z. B. Komplex II, III und IV zur Succinatoxydase zu rekonstituieren (16). Freilich darf man, auch wenn man diese Vorstellungen der GREEN'schen Schule übernimmt, nicht übersehen, daß die innere Membran, wie später besprochen werden soll, erwiesenermaßen andere Enzyme enthält, die ebenfalls als größere Komplexe auftreten, wie etwa das Prolinoxydasesystem. Die Vorstellung eines Mosaiks aus nur 4 Komplexen ist zu einfach.

Immerhin weisen elektronenoptische Befunde (18) auf den Aufbau der inneren Membran aus diskreten sog. Basiseinheiten hin. An ihrer Innenseite trägt die innere Membran gestielte Kügelchen ("knobs") (19), die zuerst als Respirationsensembles mißdeutet (19), schließlich aber als Sitz der mitochondrialen ATPase erkannt wurden (20–22). Dementsprechend haben GREEN und TZAGOLOFF gefordert (23) jede mit einem "knob" verbundene Basiseinheit der inneren Membran repräsentiere je einen der vier Respirationskomplexe.

4. GREEN hat in einer jüngst erschienenen Arbeit seine Vorstellungen etwas modifiziert und sie physikalisch zu

begründen versucht (24). In seinem sog. Proteinkristallmodell nimmt er eine locker gepackte Doppelschicht von globulären Proteinmolekülen an, die vielleicht zum größeren Teil durch polare Wechselwirkung zusammengehalten werden. Die Hohlräume zwischen den Proteinmolekülen sind vorwiegend von apolaren Proteinbezirken begrenzt, und daher mit dem Fettsäureanteil der Phospholipide gefüllt, deren polare Bezirke an die Oberfläche der Membran ragen.

Das Modell läßt sich mit elektronenoptischen Daten vereinbaren und berücksichtigt die Wichtigkeit der Protein-Protein-Wechselwirkung neben der apolaren Protein-Lipid-Wechselwirkung.

Unterschiede zwischen äußerer und innerer Membran

Es wurde bereits erwähnt, daß aus der inneren Membran im Gegensatz zur äußeren die Hauptmenge des Lipids extrahiert werden kann, ohne daß dabei die Doppelschichtstruktur verloren geht (3, 4). Nur die innere Membran trägt „knobs“ und geordnete Multienzymsysteme. Das einfache Doppelschichtmodell scheint auf sie nicht anwendbar zu sein. Sie läßt sich eher mit Chloroplasten oder bakteriellen Mesosomenmembranen vergleichen als mit den einfacher aufgebauten Plasma- oder Reticulum-Membranen. Während die äußere Membran für Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10000 unspezifisch semipermeabel ist, kann die innere nur von kleinen Molekülen (etwa bis zu einem Molekulargewicht von 150) frei passiert werden (25).

Die Lipidzusammensetzung der beiden Membranen zeigt große Unterschiede: Nur die innere Membran enthält Cardiolipin (26) und Ubichinon (27), während Cholesterin (28) und Phosphatidylinositol (26) stärker in der äußeren Membran vertreten sind.

Der höhere Cholesteringehalt der äußeren Membran erklärt, daß sie bevorzugt von Digitonin angegriffen und abgelöst wird.

Cardiolipin wiederum scheint für das Haften von Enzymen an der inneren Membran wichtig zu sein: NADH-Dehydrogenase kann durch Phospholipase A aus *Crotalus adamanteus*, die Cardiolipin nicht spaltet, nicht solubilisiert werden, wohl aber durch das Enzym aus *Naja naja*, das, wenn auch nur relativ langsam, mit Cardiolipin reagiert (3).

Innere und äußere Mitochondrienmembran unterscheiden sich aber nicht nur in Lipidzusammensetzung und Struktur, sondern auch dadurch, daß die äußere Membran im Gegensatz zur inneren gewisse Enzyme mit den Membranen des endoplasmatischen Reticulums gemeinsam hat (31, 26), von denen sie sich vielleicht entwicklungsgeschichtlich ableitet (32).

Desintegration der Mitochondrien und Lokalisierung von Enzymen

Wie erwähnt, besteht eine enge Beziehung zwischen der Membranstruktur und den Methoden, die geeignet sind, Mitochondrien in definierter Weise zu zerlegen.

Bei den dabei entstehenden submitochondrialen Partikeln handelt es sich entweder um das intakte Ensemble von innerer Membran und Matrix oder aber um verschieden große Bruchstücke der inneren Membran, die sich bei gleichzeitigem Austritt der Matrix-Enzyme bilden.

Standardisierte Desintegrationsverfahren und anschließende Trennung der Membranen haben bedeutende Fortschritte bei der Lokalisierung von Mitochondrien-enzymen ermöglicht. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Abbauprozesse für Mitochondrien und ihre spezielle Anwendung bei der Lokalisierung von Enzymen.

Tab. 1
Methoden zum Abbau von Mitochondrien und ihre Anwendung bei der Lokalisierung von Enzymen

Desintegrationsprinzip	Zur Enzymlokalisierung verwendete Modifikation	Literatur
Osmotische Lyse	Hypotone Lösungen, Wasser	32—39
Digitonin	Niedrige Konzentration (0,1 mg/mg Protein)	37, 40—42
Frieren-Tauen	In hypertonem Saccharosemedium mit flüss. Luft	43
Ultraschall	Milde Behandlung nach Schwellen in hypotoner Phosphat- und Kontraktion in hypertoner ATP-Mg ⁺⁺ -Saccharoselösung	31, 44
Enzyme	Schlangengift-Phospholipase A	45, 46

Durch die vier zuerst aufgezählten Verfahren wird bei genauer Standardisierung der Bedingungen nur die äußere Membran abgelöst. Durch differentielle oder Gradienten-Zentrifugation kann man eine Innenmembran-Matrix und eine Außenmembranfraktion isolieren. Die erstere kann weiter abgebaut werden; die Matrixenzyme werden dann frei.

Werden die Desintegrationsbedingungen nicht exakt kontrolliert, so bilden sich andere Bruchstücke. So kommt es in Abhängigkeit von der Konzentration des Digitonins zuerst nur zur Ablösung der äußeren Membran. Höhere Konzentrationen aber führen zur teilweisen Fragmentierung der inneren Membran und zum Austritt der Matrix (47, 48). Schließlich erfolgt die Zerlegung der inneren Membran in relativ kleine Bruchstücke (41, 42, 49).

Bei Behandlung von Mitochondrienpräparationen mit Schlangengift-Phospholipase A (48, 49) werden andere Enzymlokalisationen gefunden als durch die oben erwähnten Methoden. Phospholipase A greift nämlich beide Membranen eher unterschiedslos an (43), so daß gleichzeitig Enzyme der Matrix, des Intermembranraumes und der Membranen frei werden. So kam es, daß von GREEN und Mitarbeitern angenommen wurde, die Enzyme des Citratcyclus und der β -Oxydation seien locker an die äußere Membran gebunden (46, 50), was mit den durch andere Methoden gewonnenen Ergebnissen, die meist durch elektronenmikroskopische Charakterisierung der isolierten Membranen gestützt werden, nicht übereinstimmt.

Aus Experimenten mit Phospholipase kann man nur dann auf die Lokalisation eines Enzyms in der inneren Membran schließen, wenn das betreffende Enzym bei fraktionierter Extraktion von Mitochondrien mit Phos-

Tab. 2
Lokalisation einiger Mitochondrienenzyme

	Trivialname	Systematischer Name	EC	Literatur
1. Äußere Membran	Acyl-Co-A-Synthetase (ATP-abhängig, für langkettige Fettsäuren) ¹⁾	Säure: CoA-Ligase (AMP)	6.2.1.3	53—57
	Cholinphosphotransferase	CDP-Cholin: 1,2-Diglycerid-Cholinphosphotransferase	2.7.8.2	26
	Cytochrom b ₅ -artiges Hämoprotein			31, 44
	Fettsäureverlängerndes System für C ₁₄ und C ₁₆			58
	Glycerinphosphat-Acyltransferase	Acyl-Co A: L-Glycerin-3-phosphat-O-Acyltransferase	2.3.1.15	26
	Kynurenin-3-Hydroxylase	L-Kynurenin, reduziertes NADP: Sauerstoff-Oxydoreduktase (3-hydroxylierend)	1.14.1.2	35, 59, 60
	Lysophosphatid-Acyltransferase	Acyl-Co A: Lysophosphatid-O-acyltransferase	2.3.1.?	26
	Monoaminoxidase	Monoamin: Sauerstoff-Oxydoreduktase (desaminierend)	1.4.3.4	34, 35, 60, 61
	NADH-Cytochrom c-Reductase (Rotenon-insensitiv)	Reduziertes NAD: Ferricytochrom-b ₅ -Reduktase?	1.6.2.2	31, 35, 41, 44, 60, 61
	Nucleosiddiphosphat-Kinase ²⁾	ATP: Nucleosiddiphosphat-Phosphotransferase	2.7.4.6	62, 63
	Phosphatidat-Phosphatase	L- α -Phosphatidat-Phosphohydrolase	3.1.3.4	26
	Phospholipase A ₂	Phosphatid-Acylhydrolase	3.1.1.4	64
	Adenylat-Kinase	ATP: AMP-Phosphotransferase	2.7.4.3	31, 35, 43, 61
2. Intermembranraum				
3. Innere Membran	(mitochondriale) ATPase („Kopplungsfaktor F ₁ “)	ATP-Phosphohydrolase	3.6.1.3	19—22, 31, 44
	Carnitin-Palmitoyltransferase ³⁾	Palmitoyl-Co A: Carnitin-Palmitoyltransferase	2.3.1.?	53, 65
	Cholin-Dehydrogenase	Cholin: (Acceptor)-Oxydoreduktase	1.1.99.1	66
	Cytochrome a und c			35, 67
	Enoyl-CoA-Hydratase	L-3-Hydroxyacyl-CoA-Hydro-lyase	4.2.1.17	39
	Enzyme der mitochondrialen Fettsäuresynthese (Fettsäureverlängerndes System) und der β -Oxydation			58, 68—70
	Ferrochelataase	Protohäm: Ferrolyase	4.99.1.1	71—73
	Glycerinphosphat-Dehydrogenase	L-Glycerin-3-phosphat: Cytochrom c-Oxydoreduktase	1.1.2.1	52, 74
	β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	D-3-Hydroxybutyrat: NAD-Oxydoreduktase	1.1.1.30	35, 53
	β -Hydroxyacyl CoA-Dehydrogenase	L-3-Hydroxyacyl-CoA: NAD-Oxydoreduktase	1.1.1.35	39
	NADH-Dehydrogenase	Reduziertes NAD: (Acceptor)-Oxydoreduktase	1.6.99.3	31, 44
	NAD(P)-Transhydrogenase	Reduziertes NADP: NAD-Oxydoreduktase	1.6.1.1	75, 51
	Prolin-Dehydrogenase	L-Prolin: (Acceptor)-Oxydoreduktase	1.5.99.?	76
	Steroid-11 β -Hydroxylase	Steroid, reduziertes NADP: Sauerstoff-Oxydoreduktase	1.14.1.6	77, 78
	Succinat-Dehydrogenase	Succinat: Acceptor-Oxydoreduktase	1.3.99.1	31, 43, 44, 79
	Acyl-CoA-Synthetasen (ATP-abhängig, für mittlere und kurzkett. Fettsäuren)	Säure: CoA-Ligase (AMP)	6.2.1.2	54—56
	Acyl-CoA-Synthetase (GTP-abhängig)	Säure: CoA-Ligase (GDP)	6.2.1.?	80
	δ -Aminolävulinsäure-Synthetase	Succinyl-CoA: Glycin-Succinyltransferase	2.3.1.?	73
	Aspartat-Aminotransferase („GOT“) ⁴⁾	L-Aspartat: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase	2.6.1.1	35, 51, 70
	Citratcyclusenzyme (außer Succinatdehydrogenase)			31, 34, 35, 43, 63, 53, 70
4. Matrix	Glutamat-Dehydrogenase	L-Glutamat: NAD-Oxydoreduktase (desaminierend)	1.4.1.2	35, 43, 53, 72
	GTP-Adenylat-Kinase	GTP: AMP-Phosphotransferase	2. 7. 4. 10	63, 81
	Ornithin-Transcarbamylase	Carbamoylphosphat: L-Ornithin-carbamoyltransferase	2.1.3.3	35
	Phosphopyruvat-Carboxylase	GTP: Oxalacetat-Carboxy-lyase (phosphorylierend)	4.1.1.32	70
	Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure-Dehydrogenase	Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat: NAD: Oxydoreduktase		76
	Pyruvat-Carboxylase	Pyruvat-CO ₂ -Ligase (ADP)	6.4.1.1	70

¹⁾ Eine relativ geringe Aktivität einer anderen ATP-abhängigen Acyl-CoA-Synthetase für langkettige Fettsäuren (etwa 10% der Gesamtaktivität), die wahrscheinlich mit dem Enzym für Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (55) nichts zu tun hat, findet sich im Kompartiment Innere Membran-Matrix (57).

²⁾ Möglicherweise auch im Intermembranraum (35).

³⁾ Neben dem fest an die innere Membran gebundenen existiert auch ein „lösliches“ (vielleicht im Intermembranraum lokalisiertes) Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase (65).

⁴⁾ Möglicherweise auch an der Innenseite der inneren Membran gebunden (39).

pholipase später als die Hauptmenge der übrigen solubilisierbaren Proteine gelöst wird, wie wir bei NAD(P)-Transhydrogenase gezeigt haben (51).

Bei den bisher besprochenen Verfahren wird durch quantitative Enzymanalyse gezeigt, daß sich ein Enzym bevorzugt in einer durch standardisierte Desintegration hergestellten und morphologisch eindeutig zuordenbaren Fraktion befindet. Die Lokalisierung von Enzymen kann aber auch durch direkte Korrelation von Enzymaktivitätsdaten und morphometrischen Parametern gesucht werden. So wurde z. B. gezeigt, daß der Glycerophosphatoxydasegehalt der Zelle mit der Vergrößerung der inneren Mitochondrienmembran zunimmt (52).

Tabelle 2 zeigt deutlich, welcher Fortschritt in den letzten Jahren bei der Lokalisierung von Mitochondrienenzymen gemacht wurde.

Selbstverständlich sind derartig eindeutige Lokalisierungen von Enzymen, wie sie hier angenommen werden, Vereinfachungen, die nur in Grenzfällen ideal verwirklicht sind.

So findet man einen Teil der Enzyme der inneren Membran nach längerer Behandlung mit Ultraschall in der löslichen Fraktion: Der Übergang von den fest in die Membranstruktur integrierten über die relativ locker an die Innenseite der inneren Membran gebundenen zu den in der Matrix frei gelösten Enzymen ist graduell (39). Immerhin gibt es eine Reihe von sehr fest verankerten Enzymen, bei denen auch sehr intensive Ultraschallbehandlung wirkungslos bleibt. Dazu gehören die in Tabelle 2 angeführten Dehydrogenasen der inneren Membran, NAD(P)-Transhydrogenase und die Cytochrome. Das scheint die bevorzugte Stellung der Respirationskomplexe beim Aufbau der inneren Membran, wie sie von GREEN gefordert wurde, zu bestätigen. Gewisse andere Enzyme sind weniger essentiell am Einheitsmuster der Membran beteiligt und eher locker attachiert. Wie Tabelle 2 zeigt, enthält die äußere Membran, abgesehen von einigen Enzymen des Phospholipidstoffwechsels, keine geschlossene Gruppe funktionell verwandter Enzyme.

Die Enzyme des inneren Kompartiments bilden eine Gruppe, die hauptsächlich mit katabolen Vorgängen und mit der oxydativen Phosphorylierung zusammenhängt. Exakte Daten über die Lokalisation der Enzyme der mitochondrialen Proteinsynthese stehen zwar nicht zur Verfügung; da aber die mitochondriale DNA (82) und RNA (83) hauptsächlich im Kompartiment innere Membran-Matrix gefunden wird und isolierte Mitochondrien Aminosäuren in eine noch ungenügend charakterisierte, sehr hochmolekulare Proteinfraction der inneren Membran einbauen (84, 85), sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Enzyme der mitochondrialen Proteinsynthese in diesem Kompartiment lokalisiert.

Submitochondriale Partikel

Submitochondriale Partikel, die durch die weiter oben beschriebenen Abbaumethoden erhalten werden, sind Bruchstücke der inneren Membran, die sich voneinander durch ihre verschiedene Fähigkeit zur oxydativen Phosphorylierung und allgemein zu energiegekoppelten Reaktionen unterscheiden. Morphologisch äußert sich dies im Vorhandensein von Membrankügelchen, die durch Negativkontrastierung darstellbar sind und dem Kopplungsfaktor F_1 entsprechen.

Allerdings sind Detergentien, Ultraschall und mechanische Methoden nicht imstande, die innere Membran völlig von F_1 zu befreien, während Behandlung mit Harnstoff nach einer Gelfiltration sog. SU-Partikeln liefert, die praktisch kein F_1 mehr enthalten (22).

In Tabelle 3 sind einige Beispiele für submitochondriale Partikeln angeführt.

Bei der Desintegration der Mitochondrien durch Detergentien hängt es von der Art und der Konzentration des Detergens ab, wie weit die innere Membran abgebaut wird. So enthalten Digitoninpartikeln nach LEHNINGER (47, 48) keine Matrix-Enzyme mehr, da die innere Membran geöffnet wurde. Dagegen entstehen bei der milderen Prozedur von SCHNAITMAN und Mitarbeitern (34) zum größeren Teil Partikeln mit intakter innerer Membran.

Tab. 3
Submitochondriale Partikel

Bezeichnung	Charakterisierung	Präparationsmethode	Literatur
Digitoninpartikel	Bruchstück der inneren Membran; orientiert wie in intakten Mitochondrien (Kügelchen innen), phosphorylierend, Matrixenzyme fehlen	Mitochondrien mit etwa 0,5 mg Digitonin/mg Protein behandelt. Sedimentation (30 Min., 110000 g)	47, 48, 86—88
Ultraschallpartikel, phosphorylierendes Elektronentransportpartikel (ETPH)	Bruchstück der inneren Membran; umgestülpt (Kügelchen außen), Matrixenzyme fehlen	Kurze Ultraschallbehandlung von Mitochondrien, Sedimentation (30—40 Min., 110000 g)	89, 90
Nicht phosphorylierendes Elektronentransportpartikel (ETP)	Bruchstück der inneren Membran; nicht phosphorylierend, Matrixenzyme fehlen	Mechanisches Homogenisieren von Mitochondrien bei pH 8,6 oder Behandlung mit Äthanol (10%) Sedimentation (40 Min., 110000 g)	91
Keilin-Hartree-Präparation	Bruchstücke der inneren Membran. Einige energieabhängige Reaktionen erhalten	Homogenisieren von Herzmuskel mit Sand, Sedimentation der Partikel	92—94
Elementarpartikel des Elektronentransports	ETP mit angereicherten Elektronentransportkomponenten, Kombination der 4 Komplexe der Atmungskette. Nicht phosphorylierend	Behandlung der Mitochondrien mit Cholat + Desoxycholat, Isolierung des zwischen 33 und 50% Sätt. mit Ammoniumsulfat flotierenden Produktes	95
„SU-Partikel“	Nicht phosphorylierend, F_1 fehlt, keine Membrankügelchen nachweisbar	Passage submitochondrialer Partikel aus Herz durch Sephadex G-50, Entfernung von F_1 durch Behandlung mit Harnstoff	22

Jedenfalls bilden sich in beiden Fällen Partikeln, die auch aus dem detergentshaltigen Medium leicht sedimentiert werden können.

Kräftigere Detergensbehandlung (vor allem Cholat oder Desoxycholat mit Salzzusatz) baut die Membran so stark ab, daß die funktionellen Komplexe, also vor allem die des Elektronentransports frei werden und durch geeignete Methoden isoliert werden können. Solche Präparate enthalten die einzelnen Respirationskomplexe, Kombinationen derselben oder das gesamte Respirationsensemble (8–13, 95).

Die mit Hilfe von Detergens dispergierten Komplexe sedimentieren auch bei hochtouriger Zentrifugierung nicht. Obwohl von diesen Präparaten keine Molekulargewichtsbestimmungen vorliegen, kann man doch annehmen, daß sie in diesem Zustand zumindest virtuell jene ziemlich niedrigen Teilchengewichte besitzen, wie sie aus dem Gehalt an Flavinen oder Cytochromen berechnet werden können, nämlich etwa zwischen 200 000 (Komplex III) und 530 000 (Komplex I) (95). Das so ermittelte Teilchengewicht des Komplexes I ist praktisch mit dem der „echt“ gelösten NADH-Dehydrogenase identisch (96).

Entfernt man das Detergens, so werden die Präparate häufig unlöslich, da nun relativ starke Kräfte wirksam werden und sich Membranstrukturen, die als vesikuläre Gebilde auftreten, ausbilden können. Solche Präparationen werden zwar gewöhnlich als partikulär bezeichnet, man sollte sie aber trotzdem von den eigentlichen sub-mitochondrialen Partikeln (vgl. Tab. 3) unterscheiden, die ja sehr große Bruchstücke der inneren Mitochondrienmembran mit Teilchengewichten um 10^9 sind.

Praktische Aspekte

Sollen die Enzyme der inneren Mitochondrienmembran reproduzierbar bestimmt werden, ist ein Aufschluß der Mitochondrien, das heißt ein gewisser Abbau der Membranen, nötig. Meist ist es in der Praxis am einfachsten, trübe, membranhaltige Suspensionen mit Hilfe eines Detergens, von dem feststeht, daß es die interessierenden Enzyme nicht schädigt, zu klären. Eventuell kann eine hochtourige Zentrifugierung angeschlossen werden, die einen Extrakt liefert, der im günstigen Fall die untersuchten Enzyme quantitativ enthält.

Derart aufbereitete Proben eignen sich zwar wegen des Abbaus der Membran-Permeabilitätsschranken und der Beseitigung der Trübung prinzipiell gut für photometrische Tests, die Oxydoreduktasen sind aber nicht mehr in die Atmungskette integriert. Es muß also ein geeigneter artifizieller Elektronenakzeptor für die Dehydrogenasen gefunden werden, der direkt mit den partikulären und den löslichen Formen der Enzyme reagiert und die volle Geschwindigkeit der Dehydrogenase-Reaktion zu messen erlaubt. Er darf also nicht langsamer mit dem Enzym reagieren als das Substrat. Zum Beispiel ist die Bestimmung löslicher Succinat-Dehydrogenase mit den histochemisch häufig verwendeten Tetrazoliumsalzen auf direktem Weg nicht möglich, da diese wohl

über die Atmungskette von Succinat reduziert werden können, aber nicht direkt mit der Succinat-Dehydrogenase reagieren (97).

Phenazinmethosulfat dagegen reagiert direkt mit den atemungskettengebundenen Dehydrogenasen und ist daher neben Hexacyanoferrat-(III), das bei NADH-Dehydrogenase der Akzeptor der Wahl ist (98), für diese Enzyme geeignet.

Wir haben, wie später besprochen werden wird, Menadion als Akzeptor für solubilisierete und partikelgebundene Prolin- und Hydroxyprolin-Dehydrogenase verwendet.

Macht man sich auch bei der Herstellung von Gewebs-extrakten die Größe der Partikel, an die das untersuchte Enzym gebunden ist, nicht klar, können beträchtliche Fehler unterlaufen. Bei ungeeigneten Zentrifugationsbedingungen gehen dann gerade jene Partikel, die das Enzym enthalten, verloren. Ein solcher Fehler trat beispielsweise bei der Bestimmung von NAD(P)-Transhydrogenase in normalen und pathologischen Leukocyten auf (99): Das extrem niedrige Transhydrogenaseniveau, das von den Autoren gefunden wurde, geht offenbar darauf zurück, daß gemäß den verwendeten Homogenisierungsbedingungen das Enzym an große Partikel gebunden blieb und so bei der anschließenden Zentrifugierung verloren ging.

Solubilisierung der Enzyme der inneren Membran Methoden

Während Matrix-Enzyme schon durch kräftige mechanische Desintegration oder Ultraschall freigesetzt werden, erfolgt die Loslösung eines Teiles der Membranproteine nur unter ganz speziellen Bedingungen. Neben diesen Schwierigkeiten ist es bei Enzymen, die aus einer relativ festen Struktur herausgesprengt werden, schwer, Kriterien anzugeben, ob es sich um das „native“ Enzym handelt oder ob bei der Loslösung größere Veränderungen gesetzt wurden. NADH-Dehydrogenase ist ein instruktives Beispiel für solche Probleme (vgl. 96).

Sind Lipide für die Aktivität des Enzyms erforderlich, so kann es schwierig sein, eine Solubilisierungsmethode zu finden, durch die der essentielle Lipidanteil unangestastet bleibt. Die Art der Verankerung in der Membran bestimmt, welche Agentien für die Solubilisierung geeignet sind. Zwar sind apolare Proteinwechselwirkungen für den Aufbau der Membran wichtig, unter Umständen führt aber schon die Lockerung elektrostatischer Wechselwirkungen oder der Abbau von Phospholipid zum Erfolg.

Dementsprechend verschieden sind die Methoden, die zur Solubilisierung membrangebundener Enzyme verwendet wurden:

Einwirkung von Enzymen

Proteolytische Enzyme haben sich für diesen Zweck nicht bewährt. Das mag daran liegen, daß viele Enzyme in einer Lipidhülle stecken, die für ihre Aktivität (100) und speziell für Energiekonservierung und Elektronentransport erforderlich sein kann.

Das geeignete Mittel zur Solubilisierung einiger Enzyme ist Schlangengift-Phospholipase A (besonders aus Kobragift), oft in Form ungereinigter Giftpräparate. Aus den Mitochondrien von Säugetiergeweben wurden auf diese Weise NADH-Dehydrogenase (101), Cholin-Dehydrogenase (102), α -Glycerophosphat-Dehydrogenase (103) und β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (104) extrahiert. Die Methode liefert Enzympräparate, die ohne Detergens löslich sind, d. h. definitionsgemäß (105) auch nach einstündigem Zentrifugieren bei mindestens 144 000 g nicht sedimentieren und keine nennenswerte Reaktion mit O_2 mehr geben. Die Solubilisierung dieser Enzyme ist ein verhältnismäßig spezifischer Vorgang, bei dem es keineswegs zum totalen Abbau der Membran kommt, so daß schon dieser Schritt eine Anreicherung des Enzyms bringt.

Die Solubilisierung von NADH-Dehydrogenase ist spezifisch an den Cardiolipin-Abbau geknüpft, wie durch Verdauung mit *Naja naja*-Phospholipase, die Cardiolipin erst bei verhältnismäßig hoher Konzentration angreift, gezeigt wurde (29, 30). *Crotalus adamanteus*-Phospholipase, die Cardiolipin nicht angreift, kann weder NADH- noch Cholin-Dehydrogenase solubilisieren (30, 102). Cardiolipin scheint also selektiv an der Bindung Phospholipase-solubilisierbarer Enzyme beteiligt zu sein. Neben den Fettsäureketten dürften auch die beiden negativen Ladungen des Cardiolipinmoleküls zur Verankerung der Enzyme in der Membran beitragen.

Die Wirkung der Reaktionsprodukte der Phospholipase-einwirkung — Lysophosphatide und Fettsäuren — als grenzflächenaktive Agentien dürfte dagegen bei diesen spezifischen Solubilisierungsvorgängen keine Rolle spielen: einerseits werden sie schon bei Toxinkonzentrationen, die nicht auf die Dehydrogenasen wirken, reichlich gebildet, andererseits kann man sie zu Mitochondrienpräparationen zusetzen, ohne daß z. B. NADH-Dehydrogenase abgelöst wird (30).

Wie spezifisch diese Phospholipasewirkung ist, zeigt sich auch darin, daß andere Enzyme überhaupt nicht solubilisiert werden, so Cytochrom c oder Succinat-Dehydrogenase. In diesen Fällen wird das Enzym hauptsächlich durch polare Kräfte an die Membran gebunden. Wir haben die Phospholipase-Methode dadurch variiert, daß wir bei der Extraktion von Prolin-Dehydrogenase aus Rattenlebermitochondrien eine Phospholipasekonzentration einsetzten, die an sich nicht zur Solubilisierung des Enzyms hinreicht; gleichzeitig setzten wir aber noch den sog. direkt lytischen Faktor, ein basisches Polypeptid aus Schlangengift; zu. Dieses verstärkt synergistisch die Wirkung der Phospholipase und führt so zur Ablösung des Enzyms (106). Wir haben diesen Effekt eingehender an der Lysosomenmembran studiert (107) und ihn als Strukturänderung der negativ geladenen Membran durch das basische Polypeptid gedeutet (108).

Natürlich ist die Phospholipase-Methode auch durch die mögliche Inaktivierung gewisser Enzyme begrenzt. Dieser Störung kann man unter Umständen durch die Ver-

wendung eines anderen Toxins begegnen: Während wir NAD(P)-Transhydrogenase ohne weiteres durch *Agkistrodon piscivorus*-Toxin solubilisieren konnten (51), wird sie durch *Naja naja*- und *Crotalus terrificus terrificus*-Toxin inaktiviert (47). Die Ursache für diesen Unterschied dürfte die verschiedene Isoenzymzusammensetzung der Toxine (109) sein.

Extraktion mit chaotropen Agentien

Eine Reihe von Stoffen, wie große, polarisierbare Anionen (z. B. Rhodanid und Perchlorat) sowie Guanidin und Harnstoff verändern Struktur und Ordnungsgrad von Wasser so, daß apolare Proteingruppen in das Wasser eintreten können. Solche Substanzen werden daher als chaotrope Agentien bezeichnet (110, 111).

Mit dieser Methode gelingt es zum Beispiel, aus dem Respirationskomplex I eine verhältnismäßig niedermolekulare NADH-Ubichinon-Reduktase herauszulösen. Auch hier zeigt sich wieder die große Bedeutung apolarer Wechselwirkungen für die Fixierung der Dehydrogenasen an der Membran: Das chaotrope Agens schaltet die apolare Protein-Protein-Wechselwirkung innerhalb des Komplexes I aus, nämlich jene zwischen Flavoprotein und Fe-Protein. Durch Phospholipase A wird dagegen der intakte hochmolekulare NADH-Dehydrogenasekomplex aus seiner Lipidumgebung herausgelöst.

Einwirkung von grenzflächenaktiven Stoffen

Ursprünglich war behauptet worden, daß membran-gebundene Dehydrogenasen durch Detergentien solubilisiert werden (112). Da aber das Enzym aus solchen Extrakten nach Entfernung des Detergens wieder ausfällt, betrachtete man diese Systeme als Dispersionen unlöslicher Partikeln, die völlig verschieden von den eigentlichen Enzymen sind (102, 105).

Nun ist es sicher richtig, daß Detergentien stets polydisperse Lösungen liefern. Bei einigen membrangebundenen Enzymen liegt aber nach Einwirkung des Detergens ein beachtlicher Anteil schon als Teilchen vor, das nicht mehr an die Atmungskette gebunden ist. Es unterscheidet sich zwar nicht im Gewicht, wohl aber in der Löslichkeit (d. h. im Lipidgehalt) von dem durch Phospholipase „echt“ gelösten Enzym.

Wir haben gefunden, daß Detergentien (z. B. Triton X-100) und Digitonin Prolin-, Hydroxyprolin-Dehydrogenase und NAD(P)-Transhydrogenase, nicht aber α -Glycerophosphat-, Cholin- und Succinat-Dehydrogenase (106) aus dem Membranverband herauslösen (Tab. 4). Langdauernde hochtourige Zentrifugierung von Detergens-behandelten Mitochondrien entfernt also die partikelgebundenen Enzyme und stellt eine hervorragende Anreicherung der solubilisierten Enzyme dar. Damit ist auch eine Reassemblierung größerer Komplexe, wie sie aus Rekonstitutionsexperimenten bekannt ist, nicht mehr möglich.

Vortrefflich eignen sich grenzflächenaktive Stoffe auch zur Solubilisierung von Cytochrom b und c_1 (113, 114).

Tab. 4

Extraktion von Oxydoreduktasen der inneren Membran durch Einwirkung von 16 mM Triton X-100 auf Rattenlebermitochondrien und 3stündige Zentrifugierung bei 157 000 g

Enzym	EC	% solubilisiert*
Prolin-Dehydrogenase	1.5.99.2	70
Hydroxyprolin-Dehydrogenase	1.5.99.2	65
NADH-Dehydrogenase	1.6.99.3	19
NAD(P)-Transhydrogenase	1.6.1.1	8**
α -Glycerolphosphat-Dehydrogenase	1.1.2.1	5
Cholin-Dehydrogenase	1.1.99.1	3
Succinat-Dehydrogenase	1.3.99.1	1

*) Bezogen auf die Aktivität der 10 Stdn. mit Detergens behandelten Mitochondrien.

**) Digitonin solubilisiert unter gleichen Bedingungen 51 %.

Ultraschall und mechanische Desintegration

Einige locker mit der Innenseite der inneren Membran verbundenen Enzyme, wie Enoyl-Co A-Hydratase und Palmitoyl-Co A-Dehydrogenase werden durch Ultraschall in beträchtlichem Maß abgelöst (39). Kopplungsfaktor F_1 -ATPase wird schon durch Homogenisieren mit Glaskugeln solubilisiert (115, 116). Allerdings sind andere Methoden nötig, um die innere Membran völlig von F_1 zu befreien (22). Die meisten Enzyme der inneren Membran aber, speziell die Dehydrogenasen, können durch diese Methoden prinzipiell nicht solubilisiert werden.

Solvensextraktionsmethoden

Von den 25–30%, die das Lipid am Trockengewicht von Mitochondrien ausmacht, können etwa zwei Drittel, nämlich die Phospholipide, nur schwer extrahiert werden.

Die kurze Behandlung von — eventuell mit Aceton getrockneten — Mitochondrien mit Lösungsmitteln wie n-Butanol, die bevorzugt Phospholipide extrahieren (117), ermöglicht häufig die Solubilisierung bestimmter Enzyme; eventuell ist auch wie bei Cholin-Dehydrogenase die Kombination mit einer Ultraschallbehandlung erforderlich (105).

Bisweilen führt die Solvensextraktion auch zu Veränderungen der nativen Enzymstruktur. Z. B. stellt die von MAHLER und Mitarbeitern (118) durch Alkohol extrahierte NADH-Cytochrom c-Reductase ein aus der nativen NADH-Dehydrogenase entstandenes Artefakt mit niedrigem Molekulargewicht und veränderter Substratspezifität dar (96). Ähnliches gilt für die NADH-Dehydrogenase von MACKLER und Mitarbeitern (119, 120).

Änderung des Ionenmilieus

Succinat-Dehydrogenase läßt sich aus Mitochondrien-Acetonpulver schon unter mild alkalischen Bedingungen extrahieren (121, 122). Elektrostatische Wechselwirkungen spielen also bei der Membranbindung dieses Enzyms eine wichtigere Rolle als Lipidbrücken. Allerdings ist die vorangegangene Acetonbehandlung der Mitochondrien unerläßlich. Cytochrom c dagegen wird schon durch Erhöhung der Ionenstärke im sauren Bereich aus Säugetiergeweben extrahiert (vgl. z. B. 123).

Spezielle Beispiele

Prolindehydrogenase (EC 1.5.99.2)

Ein sehr typisches, aber wenig untersuchtes Beispiel für die fest strukturgebundenen Oxydoreduktasen der inneren Membran (76) ist Prolin-Dehydrogenase. Sie katalysiert den NAD-unabhängigen ersten (124, 125) Dehydrierungsschritt von L-Prolin und liefert Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure bzw. den im Gleichgewicht mit dieser stehenden Glutaminsäure- γ -semialdehyd (126, 127).

Wir haben gefunden, daß es sich um ein Flavoenzym (106) mit essentiellen SH-Gruppen (128, 129, 130) handelt, dessen Solubilisierung durch Ultraschall, proteolytische Enzyme, gallensaure Salze, Variationen von pH und Ionenstärke nicht oder fast nicht möglich ist, so daß bis jetzt stets mit der Atmungskette verbundene Präparationen („Prolinoxidase“) untersucht worden waren.

Im Säugetiergewebe spielt die Dehydrierung von Prolin verglichen mit der von NADH oder Succinat nur eine untergeordnete Rolle: der Umsatz beträgt selbst in Rattenlebermitochondrien, dem optimalen Objekt, nur etwa 30 nMol/Min. · mg Protein (106, 125, 129); im Flugmuskel gewisser Insekten ist das Enzym ein wichtiger Lieferant von Krebszyclusmetaboliten (131, 132).

Prolin-Dehydrogenase steht in analoger Beziehung zur Atmungskette wie Succinat-Dehydrogenase (133), so daß P/O-Quotienten um 2 (134) und endergone NAD⁺-Reduktion durch Prolin (135) gefunden werden.

Zu unserer Überraschung fanden wir bei der Fraktionierung von Lebermitochondrienextrakten, die mit Triton X-100 hergestellt worden waren, daß Hydroxyprolin durch ein anderes, freilich verwandtes, Enzym dehydriert wird als Prolin (129).

Das widerspricht zwar älteren Ansichten (136), steht aber im Einklang mit zwei von EFRON entdeckten Störungen des Aminosäurestoffwechsels beim Menschen: Bei der Hydroxyprolinämie kommt es zu stark erhöhten Hydroxyprolinkonzentrationen in Blut und Harn, während der Prolinspiegel normal bleibt (137); bei der Hyperprolinämie, bei der allerdings auch die Hydroxyprolinausscheidung erhöht ist, kommt es zu einer entsprechenden Steigerung des Prolinspiegels (138). Bei beiden Störungen kann man auf einen genetisch bedingten Ausfall der korrespondierenden Dehydrogenase schließen.

Prolin-Dehydrogenase unterscheidet sich in ihrem Solubilisierungsverhalten stark von Succinat-Dehydrogenase. Sie wird aus acetongetrockneten Mitochondrien durch Pufferlösungen verschiedener pH-Werte und verschiedener Ionenstärken nicht extrahiert (106).

Die Solubilisierung des Enzyms gelang uns durch Behandlung von Lebermitochondrien mit Schlangengift (*Agkistrodon piscivorus*-Toxin). Wie schon erwähnt, kann man bei Verwendung von gereinigter Phospholipase A nur dann einen vergleichbaren Effekt erzielen, wenn man außerdem den „direkt lytischen Faktor“, ein basisches Polypeptid aus Kobragift, zusetzt (106).

Solubilisierete Prolin-Dehydrogenase reagiert nicht mehr mit molekularem O_2 und weist sich durch eine breite Absorptionsbande um 410 nm und ein entsprechendes Maximum im Differenzspektrum (oxydiert minus reduziert) als Flavoprotein aus.

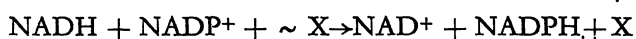
Die — verglichen mit anderen Dehydrogenasen der inneren Membran — ungewöhnlich gute Solubilisierbarkeit von Prolin- und Hydroxyprolin-Dehydrogenase durch das nichtionische Detergens Triton X-100 wurde schon besprochen (vgl. Tab. 4).

Gemäß ihren Löslichkeitseigenschaften ist also Prolin-Dehydrogenase vorwiegend durch apolare Wechselwirkungen fest an die Membran gebunden. Sie wird dementsprechend bei experimenteller Leberschädigung nicht in größerem Ausmaß von den Membranen abgelöst und unterscheidet sich so charakteristisch von der Succinat-Dehydrogenase (siehe nächsten Abschnitt), die vorwiegend durch polare Kräfte an der Membran gehalten wird.

NAD(P)-Transhydrogenase (EC 1.6.1.1)

(„TD-Transhydrogenase“, NADPH: NAD⁺-Oxydoreduktase) ist ebenfalls ein sessiles Enzym der inneren Membran (51, 75). Es wurde von KAPLAN (49, 139) erstmals durch Digitonin aus Säugetiermitochondrien extrahiert.

Sowohl die energieabhängige Reduktion von NADP⁺ durch NADH



($\sim \text{X}$ bedeutet ein energiereiches nicht phosphoryliertes Zwischenprodukt der oxydativen Phosphorylierung) (140, 141), als auch die nicht energieabhängige Reduktion von NAD⁺ durch NADPH werden durch dasselbe Enzym katalysiert (142, 143).

Obwohl Transhydrogenase in einer Reihe von Geweben wie Skelett- und Herzmuskel, Niere und Leber mit relativ hoher spezifischer Aktivität vorkommt (144), ist keineswegs sicher, daß sie ein obligatorischer Mitochondrienbestandteil ist; wir haben z. B. in gewissen Tumorzellen (145) und in braunem Fettgewebe (146) sehr geringe Aktivitäten vorgefunden.

Es ist ungeklärt, ob in Tumorzellen irgendeine Beziehung zwischen NAD(P)-Transhydrogenasegehalt und Malignität besteht. Da aber die Zelle NAD-gebundenen Wasserstoff bevorzugt via Atmungskette zur Energiegewinnung verbraucht, während der Wasserstoff von NADPH der reduktiven Biosynthese dient, kommt der Transhydrogenase eine Regulationsfunktion zu (147, 148), die speziell in Geweben mit hoher Syntheserate wichtig sein könnte. Jedenfalls verdient das Enzym klinisch-chemische Beachtung. Über die Änderung seiner Aktivität bei experimentellen Leberschäden wird unten berichtet.

Von der TD-Transhydrogenase zu unterscheiden ist die DD-Transhydrogenase (NADH:NAD⁺-Oxydoreduktase). Entgegen der ursprünglichen Annahme (149) handelt es sich bei den beiden Transhydrogenasen um zwei verschiedene Enzyme, deren Trennung uns durch Gel-

Filtration gelungen ist (150). Die DD-Aktivität dürfte vor allem auf Lipoamid-Dehydrogenase (151) zurückgehen.

NAD(P)-Transhydrogenase wird durch verschiedene Detergentien solubilisiert; wir konnten durch mehrstündige Zentrifugierung digitonisierter Rattenlebermitochondrien bei 157 000 g das Enzym nicht sedimentieren. Triton X-100 dagegen läßt die Transhydrogenase an größere Membranstücke gebunden, die zwar nach 1 Std. bei 100 000 g noch nicht (152), wohl aber nach 3 Std. bei 157 000 g sedimentieren (vgl. Tab. 3).

Wir haben das Enzym durch Einwirkung von Schlangengift auf Mitochondrien solubilisiert (51). Art und Konzentration des Giftes ist ausschlaggebend, da jener Anteil der Phospholipide, der für die Erhaltung der Aktivität essentiell ist (149), nicht abgespalten werden darf.

Pathophysiologische Aspekte der membrangebundenen Mitochondrienenzyme

Die vorangehenden Ausführungen haben gezeigt, daß es möglich ist, durch geeignete Verfahren membrangebundene Mitochondrienenzyme zu solubilisieren und quantitativ zu erfassen.

In der Diagnostik haben aber die Enzyme der inneren Mitochondrienmembran kaum Beachtung gefunden, obwohl sich eine Reihe von ihnen (vgl. Tab. 2) schon durch ihre leichte Meßbarkeit dafür anbietet. Sie treten nämlich wegen ihrer festen Verankerung in der Membran nicht in das Blut über.

Obwohl sich also die Untersuchung dieser Enzyme auf Biopsieproben beschränken muß, sind die Voraussetzungen für ihre Bestimmung durchaus gegeben, da heute einfache Methoden zur Fraktionierung kleinster Gewebeproben zur Verfügung stehen (vgl. z. B. 153).

Jedenfalls läßt die Erweiterung des Enzymmusters verschiedener Gewebe durch Einbeziehen membrangebundener Mitochondrienenzyme wertvolle diagnostische Hinweise erwarten, wie die Betrachtung bisher vorliegender Ergebnisse zeigen soll.

Experimentelle Schädigung der Leber

Bei Ratten wurde Leberschädigung durch Ischämie oder Tetrachlorkohlenstoff hervorgerufen und ein Absinken von Cytochromoxydase und Succinat-Dehydrogenase beobachtet (154, 155); andere Autoren berichten eine Steigerung von Succinat- und NADH-Dehydrogenase in der Mäuseleber nach Cyclophosphamid (156).

Wir haben unser Augenmerk ebenfalls auf Succinat-Dehydrogenase und auf die oben näher besprochenen Enzyme Prolin- und Hydroxyprolin-Dehydrogenase sowie NAD(P)-Transhydrogenase gerichtet und Leberschäden durch einmalige Tetrachlorkohlenstoffgaben untersucht (157). Dabei zeigte sich ein bemerkenswerter Unterschied zwischen Matrixenzymen und Membranenzymen: Während die Matrixenzyme bereits 6 Stunden nach der Applikation absinken (158), steigt die spezifische Aktivität sowohl der Prolin- und der Hydroxyprolin-Dehydrogenase als auch der Transhydrogenase

während des ersten Tages nach der Applikation an. Die beiden erstgenannten Enzyme erreichen aber ihr Maximum schon nach 16 Stunden und fallen dann unter die Norm; Transhydrogenase dagegen hat erst nach 2 Tagen ein markantes Maximum (180% der Norm) erreicht und fällt während der folgenden Tage auf die Norm oder knapp darunter. Hingegen sinkt Succinat-Dehydrogenase während des ersten Tages und steigt dann langsam auf Werte, die etwa 20% über der Norm liegen.

Dieses von uns untersuchte, freilich sehr spezielle Beispiel zeigt, daß sich die Atmungsketten-gebundenen Oxydoreduktasen bei Zellschädigung durchaus verschieden verhalten. Es liegt nahe, anzunehmen, daß bestimmten pathologischen Zuständen charakteristische Muster strukturgebundener Enzyme zugeordnet werden können.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse hat man zwei Haupteffekte, die sich u. U. überlagern, zu berücksichtigen: 1. Die Permeabilitätsschädigung der Mitochondrienmembran, die zum Austritt der Matrixenzyme und bei sehr starker Veränderung der Membran auch zur Ablösung einzelner Membran-Dehydrogenasen wie der Succinat-Dehydrogenase führt. Das bewirkt eine Steigerung der spezifischen Aktivität der sessil gebliebenen Prolin-Dehydrogenase, die sich aber nicht in der Aktivität pro g Gewebe äußert. 2. Eine Steigerung der Synthese gewisser Enzymproteine, die durch ein toxisches Agens oder seine Metaboliten bewirkt wird, und etwas später als die Membranschädigung einsetzt. Bei NAD(P)-Transhydrogenase erscheint diese Erklärung der starken Aktivitätserhöhung plausibel, weil hier auch die auf das Gewebsgewicht bezogene Aktivität zunimmt.

Eine solche adaptative Synthese eines Mitochondrienenzym wurde bis jetzt nur bei der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase nach Gaben gewisser Pharmaka oder von Äthanol beobachtet (159), die mit der Vermehrung des endoplasmatischen Reticulums bzw. der Pharmaka-Entgiftungsenzyme einhergehen (160).

Ähnlich wie bei der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase könnte man bei der NAD(P)-Transhydrogenase den Sinn ihrer Erhöhung in einer Förderung der Detoxikationsvorgänge sehen, wobei über die Transhydrogenase NADPH erzeugt und für mikrosomale Hydroxylierungen zur Verfügung gestellt wird.

Klinische Beobachtungen

Ältere Untersuchungen über Succinat-Dehydrogenase, Cytochromoxydase (161) und NADH-Cytochrom c Reduktase (162) in der cirrhotischen menschlichen Leber haben keine Änderungen der spezifischen, wohl aber eine Senkung der auf das Gewebsgewicht bezogenen Aktivitäten und eine starke Schädigung der oxydativen Phos-

phorylierung ergeben (162). Verringerte Fähigkeit zur oxydativen Phosphorylierung ist aber eine allgemeine Eigenschaft der Mitochondrien in der geschädigten Leber (162, 163); wir haben das auch beim Meer-schweinchen nach Gaben des hepatotoxischen Alkaloids Imperatorin bestätigt gefunden (164, 165).

Von SCHERSTÉN und Mitarbeitern (163) wurde eine Verminderung der Succinat-Oxydation, die bei akuter Hepatitis, nicht aber beim Verschlußikterus auftritt, beschrieben. Auch in Leber-Biopsie- und Autopsiematerial von chronischen Alkoholikern ist die Succinat- und die NADH-Dehydrogenase stark erniedrigt (166).

Die Deutung solcher experimenteller und klinischer Befunde muß von einigen prinzipiellen Wirkungen auf die Membranen des geschädigten Gewebes ausgehen:

1. Drastische Zellschädigungen wirken sich in einem Abbau der Mitochondrienmembran aus. Speziell die leichter solubilisierbaren Enzyme sinken ab, während fester haftende Enzyme an den fragmentierten Membranen verbleiben. Dieser Unterschied wird z. B. oben am verschiedenen Verhalten von Succinat-Dehydrogenase und Prolin-Dehydrogenase demonstriert.

2. Die Beeinflussung der Proteinsynthese in den geschädigten Zellen kann zur Folge haben, daß sich defekte Membranen mit unvollständiger Enzymausrüstung bilden. Andererseits kann unter pathologischen Bedingungen die Synthese gewisser Enzyme adaptativ gefördert werden, so daß es zur Steigerung der spezifischen Aktivität kommt. Diese Möglichkeit wurde anhand der NAD(P)-Transhydrogenase diskutiert.

3. Schon bei verhältnismäßig geringfügigen toxischen Veränderungen ändert sich der dynamische Zustand der Mitochondrienmembran und die oxydative Phosphorylierung sinkt stark ab.

Ausblick

Die strukturgebundenen Mitochondrienenzyme haben gerade durch ihren hochgeordneten festen Einbau in die Membran die Enzymchemie vor beträchtliche Probleme gestellt. Die schwierige Ablösbarkeit ist aber andererseits vom Standpunkt der klinischen Chemie interessant: Hier äußern sich vorwiegend schwere, zum partiellen Abbau der Membran führende Schädigungen. Entsprechend der geschilderten Verschiedenheit der Solubilisierungsbedingungen in vitro sind auch in vivo klinisch diagnostisch interessante Unterschiede zu erwarten.

Gerade heute, da immer häufiger Biopsiematerial untersucht wird, lohnt es sich, diese Enzyme auch in der Medizin stärker in Betracht zu ziehen. Wir sind zur Zeit bestrebt, an Leber und Niere entsprechende Untersuchungen durchzuführen.

Literatur

1. DANIELLI, J. F. und H. A. DAVSON, *J. Cellul. Comp. Physiol.*, Philadelphia 5, 495 (1935). — 2. ROBERTSON, J. D., *J. biophys. biochem. Cytol.* 4, 349 (1958). — 3. FLEISCHER, S., B. FLEISCHER und W. STOCKENIUS, *J. Cell. Biol.* 32, 193 (1967). — 4. FLEISCHER, S., G. BRIERLEY, H. KLOUWEN und D. B. SLAUTTERBACK, *J. biol.*

Chemistry 237, 3264 (1963). — 5. BENSON, A. A., *Annual. Rev. Plant Physiol.* 15, 1 (1964). — 6. SJÖSTRAND, F. S., *J. Ultrastruct. Research* 9, 561 (1963). — 7. GREEN, D. E. und J. F. PERDUE, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 55, 1295 (1966). — 8. HATEFI, Y., A. G. HAAVIK und D. E. GRIFFITHS, *J. biol. Chemistry* 237,

Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors

Munich, November 4—6, 1970

edited by **H. Fritz** and **H. Tschesche**

XII, 304 pages. With 246 figures and 95 tables. 1971.

Bound DM 108,—; \$ 31.75

Contents:

Proteinase Inhibitors in Human Medicine · Specific Isolation Methods · Inhibition Mechanism: Theories and Methods · Inhibitors of Plant Tissues · Basic Bovine Inhibitor and Related Inhibitors · Pancreatic Secretory Inhibitors · Seminal Inhibitors, Inhibitors and Fertilization · Inhibitors from Dog Submandibular Glands, *Ascaris Lubricoides* and Leeches.

Contributions by:

Birk, Coan, Čechová, Dlouhá-Keil, Feeney, Feinstein, Fink, Fritz, Greene, Haendle, Heimbürger, Hochstraßer, Huber, Ikenaka, Kassell, Laskowski Jr., Laskowski Sr., Liener, Peanasky, Rigbi, Ryan, Schumacher, Shotton, Stevens, Tschesche, Werle, Zaneveld.



Walter de Gruyter · Berlin · New York

Interkama'71 **Düsseldorf**

5. Internationaler Kongreß mit Ausstellung für Meßtechnik und Automatik vom 14. bis 20. Oktober 1971

Information: Düsseldorf Messegesellschaft mbH - NOWEA - und Arbeitsgemeinschaft INTERKAMA, 4 Düsseldorf, Dulsburger Str. 1a, Tel.: 02 11/4 40 41



BIOCHIMIE

Edité par la Société de Chimie Biologique

tel est le titre
sous lequel paraîtra à partir de 1971

le „BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“

SECRÉTARIAT

de la Société de Chimie Biologique

J. P. EBEL, Secrétaire Général (Relations Extérieures)
R. PERLES, Secrétaire Général

REDACTION

F. GROS, Secrétaire scientifique
F. PERCHERON, Secrétaire à la Publication
J. NUNEZ, Secrétaire à l'Information
Y. RAOUL, Secrétaire à l'Edition

SECRETARIAT et REDACTION: 4 Avenue de l'Observatoire, PARIS 6^e

12 FASCICULES

ABONNEMENTS: FRANCE et ZONE FRANC: 150 ffrs · BELGIQUE: 1.687,— ffrs · AUTRES PAYS: 186,— ffrs

MASSON et Cie, Editeurs · 120 Boulevard St Germain · PARIS 6^{ème}

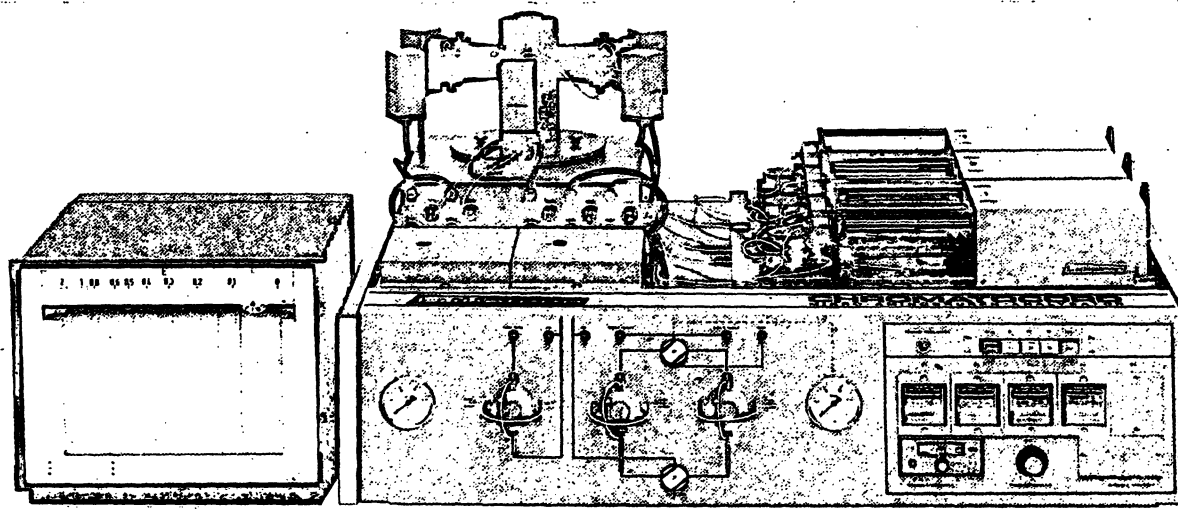
MIKRO-AMINOSÄUREN-ANALYSATOR

CHROMATOCORD
MODELL CHR-1

EIN ECHTES MIKRO-GERÄT FÜR DEN
SUBMIKROBEREICH VON 20 PICOMOL
BIS 10 NANOMOL MIT SCHLAUCH-
SÄULEN VON 0,7 mm DURCHMESSER UND
ABSOLUT GLEICHMÄSSIG FÖRDERNDEN
PRÄZISIONSPUMPEN, DIE GLEICHZEITIG
ALS VORRATSGEFÄSSE DIENEN

AUSSERDEM:

- unübertroffen einfache Bedienung + EDV
- sparsamster Betrieb (0.75 ml Harzfüllung)
- kleinste Probenmengen (10 bis 100 µl)
- automatische Probeneingabe
- zwei komplette Analysen gleichzeitig
- preiswerter Halbmikrozusatz für Routine



Labotron

Meßtechnik GmbH - 8191 Gelting - Wolfratshauser Str. 2 - Tel. 08171 / 208

- 1676 (1962). — 9. ZIEGLER, D. M. und K. A. DOEG, Arch. Biochem. Biophysics 97, 41 (1962). — 10. HATEFI, Y., A. G. HAAVIK und D. E. GRIFFITHS, J. biol. Chemistry 237, 1681 (1962). — 11. RIESKE, J. S., R. E. HANSEN und W. S. ZAUGG, J. biol. Chemistry 239, 3017 (1964). — 12. RIESKE, J. S., W. S. ZAUGG und R. E. HANSEN, J. biol. Chemistry 239, 3023 (1964). — 13. FOWLER, L. R., S. H. RICHARDSON und Y. HATEFI, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 64, 170 (1962). — 14. BONT, W. S., P. EMMELOT und H. VAZ DIAS, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 173, 389 (1969). — 15. HATEFI, Y., A. G. HAAVIK und D. E. GRIFFITHS, Biochem. biophysic. Res. Commun. 4, 447 (1961). — 16. FOWLER, R. L. und Y. HATEFI, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 203 (1961). — 17. HATEFI, Y., A. G. HAAVIK, R. L. FOWLER und D. E. GRIFFITHS, J. biol. Chemistry 237, 2661 (1962). — 18. FERNANDEZ-MORAN, H., T. ODA, P. V. BLAIR, D. E. GREEN, J. Cell Biol. 22, 63 (1964). — 19. FERNANDEZ-MORAN, H., Circulation, (New York) 26, 1039 (1962). — 20. KAGAWA, Y. und E. RACKER, J. biol. Chemistry 241, 2475 (1966). — 21. SCHATZ, G., H. S. PENEFSKY und E. RACKER, J. biol. Chemistry 242, 2552 (1967). — 22. RACKER, E. und L. L. HORSTMAN, J. biol. Chemistry 242, 2547 (1967). — 23. GREEN, D. E. und A. TZAGOLLOFF, Arch. Biochem. Biophysics 22, 63 (1964). — 14. VANDERKOOI, G. und D. E. GREEN, Proc. nat. Acad. Sci., USA 66, 615 (1970). — 15. PFAFF, E., M. KLINGENBERG, E. RITT und W. VOGELL, Europ. J. Biochem., (Berlin) 5, 222 (1968). — 26. STOFFEL, W., H.-G. SCHIEFER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1017 (1968). — 27. SOTTOCASA, G. L., Biochem. J. 105, 1 (1968). — 28. PARSONS, D. F., Y. YANO, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 135, 362 (1967). — 29. AWASTHI, Y. C., E. BEREZNY, F. J. RUZICKA und F. L. CRANE, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 189, 457 (1969). — 30. AWASTHI, Y. C., F. J. RUZICKA und F. L. CRANE, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 203, 233 (1970). — 31. SOTTOCASA, G. L., B. KUYLENSTIERNA, L. ERNSTER, A. BERGSTRAND, Meth. Enzymol. 10, 448 (1967). — 32. PARSONS, D. F., G. R. WILLIAMS, W. THOMPSON, D. WILSON, A. BERGSTRAND, in: Round Table Discussion on Mitochondrial Structure and Compartmentation, Ed. by E. QUAGLIARIELLO, E. C. SLATER, S. PAPA, J. M. TAGER, S. 29, Adriatica Ed. Bari (1967)). — 33. PARSONS, D. F. und G. R. WILLIAMS, Meth. Enzymol. 10, 443 (1967). — 34. SCHNAITMAN, C., V. G. ERWIN und J. W. GREENAWALT, J. Cell Biol. 32, 719 (1967). — 35. SCHNAITMAN, C. und J. W. GREENAWALT, J. Cell Biol. 38, 158 (1968). — 36. CAPLAN, A. I. und J. W. GREENAWALT, J. Cell Biol. 31, 455 (1966). — 37. CAPLAN, A. I. und J. W. GREENAWALT, J. Cell Biol. 36, 15 (1968). — 38. WIT-PEETERS, E. M., H. R. SCHOLTE und H. L. ELENBAAS, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 210, 360 (1970). — 39. WIT-PEETERS, E. M., H. R. SCHOLTE, F. VAN DEN AKKER und I. DE NIE, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 231, 23 (1971). — 40. LÉVY, M., R. TOURY und J. ANDRÉÉ, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 135, 599 (1967). — 41. HOPPEL, C. und C. COOPER, Biochem. J. 107, 367 (1968). — 42. MORTON, D. J., C. HOPPEL und C. COOPER, Biochem. J. 107, 377 (1968). — 43. BRDICKA, D., D. PETTE, G. BRUNNER und F. MILLER, Europ. J. Biochem., (Berlin) 5, 294 (1968). — 44. SOTTOCASA, G. L., B. KUYLENSTIERNA, L. ERNSTER, A. BERGSTRAND, J. Cell Biol. 32, 415 (1967). — 45. BACHMANN, E., D. W. ALLMANN und D. E. GREEN, Arch. Biochem. Biophysics 115, 153 (1966). — 46. ALLMANN, D. W., E. BACHMANN, N. ORME-JOHNSON, W. C. TAN und D. E. GREEN, Arch. Biochem. Biophysics 125, 981 (1968). — 47. COOPER, C. und A. L. LEHNINGER, J. biol. Chemistry 219, 489 (1956). — 48. DEVLIN, T. M. und A. L. LEHNINGER, J. biol. Chemistry 233, 1586 (1958). — 49. KAUFMAN, B. und N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry 236, 2133 (1961). — 50. ALLMANN, D. W., E. BACHMANN und D. E. GREEN, Arch. Biochem. Biophysics 115, 165 (1966). — 51. SALVENMOSER, F. und R. KRAMAR, Enzymologia 40, 322 (1971). — 52. BROSEMER, R. W., W. VOGELL und TH. BÜCHER, Biochem. Z. 338, 854 (1963). — 53. NORUM, K. R., M. FARSTAD und J. BREMER, Biochem. biophysic. Res. Commun. 24, 794 (1966). — 54. AAS, M., Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 231, 32 (1971). — 55. AAS, M. und J. BREMER, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 164, 157 (1968). — 56. SKREDE, S. und J. BREMER, Europ. J. Biochem., (Berlin) 14, 465 (1970). — 57. VAN TOL, A. und W. C. HÜLSMANN, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 223, 416 (1970). — 58. COLLI, W., P. HINKLE und M. E. PULLMAN, Federation Proc. 27, 648 (1968). — 59. OKAMOTO, H., O. HAYAISHI, Arch. Biochem. Biophysics 131, 603 (1969). — 60. BEATTIE, D. S., Biochem. biophysic. Res. Commun. 31, 901 (1968). — 61. MARCO, R., J. SEBASTIAN und A. SOLS, Biochem. biophysic. Res. Commun. 34, 725 (1969). — 62. SCHNAITMAN, C. und P. L. PEDERSEN, Biochem. biophysic. Res. Commun. 30, 428 (1968). — 63. LIMA, M. S., G. NACHBAUR und P. V. VIGNAIS, C. r. hebdom. Séances, Acad. Sci. Paris, Sér. D 266, 739 (1968). — 64. NACHBAUR, J. und P. M. VIGNAIS, Biochem. biophysic. Res. Commun. 33, 315 (1968). — 65. WEST, D. W., J. F. A. CHASE und P. K. TUBBS, Biochem. biophysic. Res. Commun. 42, 912 (1971). — 66. KAISER, W. und F. L. BYGRAVE, Europ. J. Biochem., (Berlin) 4, 582 (1968). — 67. KLINGENBERG, M., in: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, Hrsg., P. KARLSON, S. 69—85, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963). — 68. BEATTIE, D. S., Biochem. biophysic. Res. Commun. 30, 57 (1968). — 69. QUAGLIARIELLO, E., C. LANDRISCINA, P. CORATELLI, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 164, 12 (1968). — 70. LANDRISCINA, C., S. PAPA, P. CORATELLI, L. MAZZARELLA und E. QUAGLIARIELLO, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 205, 136 (1970). — 71. MCKAY, R., R. DRUYAN und M. RABINOWITZ, Federation Proc. 27, 774 (1968). — 72. JONES, M. S. und O. T. G. JONES, Biochem. biophysic. Res. Commun. 31, 977 (1968). — 73. MCKAY, R., R. DRUYAN, G. S. GETZ und M. RABINOWITZ, Biochem. J. 114, 455 (1969). — 74. PETTE, D., in: „Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria“ ed. by TAGER J. M., S. PAPA, E. QUAGLIARIELLO und E. C. SLATER, Bd. 7, BBA Library Elsevier, Amsterdam (1966). — 75. DANIELSON, L. und L. ERNSTER, Biochem. Z. 338, 188 (1963). — 76. BRUNNER, G. und W. NEUPERT, FEBS Letters 3, 283 (1969). — 77. YAGO, N. und S. ICHII, J. Biochem. 65, 215 (1969). — 78. DODGE, A. H., A. K. CHRISTENSEN und R. B. CLAYTON, Endocrinology 87, 254 (1970). — 79. KALINA, M., B. WEAVERS und A. G. E. PEARSE, Nature, (London) 221, 479 (1969). — 80. ROSSI, C. R. und D. M. GIBSON, J. biol. Chemistry 239, 1694 (1964). — 81. HELDT, W. H. und K. SCHWALBACH, Europ. J. Biochem., (Berlin) 1, 199 (1967). — 82. NASS, M. M. K. und S. NASS, J. Cell Biol. 19, 593 (1963). — 83. BEATTIE, D. S., R. E. BASFORD und S. B. KORITZ, Biochemistry, (Washington) 6, 3099 (1967). — 84. NEUPERT, W., D. BRDICKA und TH. BÜCHER, Biochem. biophysic. Res. Commun. 27, 488 (1967). — 85. BEATTIE, D. S., G. M. PATTON und R. N. STUCHELL, J. biol. Chemistry 245, 2177 (1970). — 86. LÖW, H. und I. VALLIN, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 69, 361 (1963). — 87. HAAS, D. W. und W. B. ELLIOTT, J. biol. Chemistry 238, 1132 (1963). — 88. MALVIYA, A. N., B. PARSIA, R. E. YODAIAKEN und W. B. ELLIOTT, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 162, 195 (1968). — 89. LINNANE, A. W. und D. M. ZIEGLER, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 29, 630 (1958). — 90. KIELLEY, W. W. und J. R. BRONK, J. biol. Chemistry 230, 521 (1958). — 91. CRANE, F. L., J. L. GLENN und D. E. GREEN, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 22, 475 (1956). — 92. KEILIN, D. und E. F. HARTREE, Proc. Roy. Soc. B 129, 277 (1940). — 93. KEILIN, D. und E. F. HARTREE, Biochem. J. 44, 205 (1949). — 94. KING, T. E., J. biol. Chemistry 236, 2342 (1961). — 95. BLAIR, P. V., T. ODA, D. E. GREEN und H. FERNÁNDEZ-MORÁN, Biochemistry, (Washington) 2, 756 (1963). — 96. SINGER, T. P. und M. GUTMAN, in: „Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases“. Ed. SUND, H., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970). — 97. GIUDITTA, A. und T. P. SINGER, J. biol. Chemistry 234, 662 (1959). — 98. MINAKAMI, S., R. L. RINGLER und T. P. SINGER, J. biol. Chemistry 237, 569 (1962). — 99. SILBER, R., F. M. HUENNEKENS und B. W. GABRIO, J. Clin. Invest. 42, 1908 (1963). — 100. SEKUZU, I., P. JURTSCHUK, Jr. und D. E. GREEN, J. biol. Chemistry 238, 975 (1963). — 101. RINGLER, R. L., S. MINAKAMI und T. P. SINGER, J. biol. Chemistry 238, 801 (1963). — 102. RENDINA, G. und T. P. SINGER, J. biol. Chemistry 234, 1605 (1959). — 103. RINGLER, R. L., J. biol. Chemistry 236, 1192 (1961). — 104. FLEISCHER, B., A. CASU und S. FLEISCHER, Biochim. biophysic. Res. Commun. 24, 189 (1966). — 105. EBISUZAKI, K.

- und J. N. WILLIAMS, *Biochem. J.* 60, 644 (1955). — 106. KRAMAR, R., in Vorbereitung. — 107. KRAMAR, R., R. LAMBRECHTER und E. KAISER, *Toxicon* 9, 125 (1971). — 108. KAISER, E., R. KRAMAR und R. LAMBRECHTER, *Proc. 2nd Int. Symp. Animal and Plant Toxins*, Tel Aviv (1970). — 109. SALACH, J. I., P. TURINI, J. HAUBER, R. SENG, H. TISDALE und T. P. SINGER, *Biochim. biophys. Res. Commun.* 33, 936 (1968). — 110. DAVIS, K. A. und Y. HATEFI, *Biochemistry*, (Washington) 8, 3355 (1969). — 111. HATEFI, Y. und W. G. HANSTEIN, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 62, 1129 (1969). — 112. WILLIAMS, J. N., Jr. und A. SREENIVASAN, *J. biol. Chemistry* 203, 899 (1953). — 113. BOMSTEIN, R., R. GOLDBERGER und H. TISDALE, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 50, 527 (1961). — 114. GOLDBERGER, R., A. L. SMITH, H. TISDALE und R. BOMSTEIN, *J. biol. Chemistry* 236, 2788 (1961). — 115. PULLMAN, M. E., H. S. PENEFSKY, A. DATTA und E. RACKER, *J. biol. Chemistry* 235, 3322 (1960). — 116. PENEFSKY, H. S., M. E. PULLMAN, A. DATTA und E. RACKER, *J. biol. Chemistry* 235, 3330 (1960). — 117. MORTON, R. K., *Biochem. J.* 57, 595 (1954). — 118. MAHLER, H. R., N. K. SARKAR, L. P. VERNON und R. A. ALBERTI, *J. biol. Chemistry* 199, 585 (1952). — 119. MACKLER, B., *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 50, 141 (1961). — 120. MACKLER, B., R. J. ERICKSON, S. D. DAVIS, T. D. MEHL, C. SHARP, R. J. WEDGWOOD, G. PALMER und T. E. KING, *Arch. Biochem. Biophysics* 125, 40 (1968). — 121. KEARNEY, E. B., T. P. SINGER, *J. biol. Chemistry* 219, 963 (1956). — 122. SINGER, T. P., E. B. KEARNEY und P. BERNATH, *J. biol. Chemistry* 223, 599 (1956). — 123. KEILIN, D. und E. F. HARTREE, *Biochem. J.* 39, 289 (1945). — 124. JOHNSON, A. B. und H. J. STRECKER, *J. biol. Chemistry* 237, 1876 (1962). — 125. KRAMAR, R., *Enzymologia* 33, 33 (1967). — 126. LANG, K. und G. SCHMIDT, *Biochem. Z.* 322, 1 (1951). — 127. VOGEL, H. J. und B. DAVIS, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 109 (1952). — 128. LANG, K. und H. LANG, *Biochem. Z.* 329, 577 (1958). — 129. KRAMAR, R. und P. FITSCHA, *Enzymologia* 39, 101 (1970). — 130. KRAMAR, R. und E. KAISER, *Experientia*, (Basel) 26, 485 (1970). — 131. SACKTOR, B. und C. C. CHILDRESS, *Arch. Biochem. Biophysics* 120, 583 (1967). — 132. CRABTREE, B. und E. A. NEWSHOLME, *Biochem. J.* 117, 1019 (1970). — 133. ERECIŃSKA, *Acta biochim. polon.* 13, 209 (1966). — 134. BRYZA, J., Z. KANIUGA und B. FRACKOWIAK, *Bull. Acad. polon. Sci. Sér. Sci. biol.* 15, 715 (1967). — 135. KRAMAR, R., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 349, 1423 (1968). — 136. TAGGART, J. V. und R. B. KRAKAUR, *J. biol. Chemistry* 177, 641 (1949). — 137. EFRON, M. L., E. M. BIXBY und C. V. PRYLES, *New England J. Med.* 272, 1299 (1965). — 138. EFRON, M., *New England J. Med.* 272, 1243 (1965). — 139. KAPLAN, N. O., S. P. COLOWICK und E. F. NEUFELD, *J. biol. Chemistry* 205, 1 (1953). — 140. KLINGENBERG, M. und W. SLENCZKA, *Biochem. Z.* 331, 486 (1959). — 141. DANIELSON, L. und L. ERNSTER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 91 (1963). — 142. KAWASAKI, T., K. SATOH und N. O. KAPLAN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 648 (1964). — 143. LEE, C. P., N. SIMARD-DUQUESNE, L. ERNSTER und H. D. HOBERMAN, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 105, 397 (1965). — 144. STEIN, A. M., N. O. KAPLAN und M. M. CIOTTI, *J. biol. Chemistry* 234, 979 (1959). — 145. SALVENMOSER, F., R. KRAMAR und F. SEELICH, *Enzymologia* 30, 237 (1966). — 146. LINDBERG, O. und R. KRAMAR, unveröffentlichte Versuche. — 147. KAPLAN, N. O., M. N. SWARTZ, M. E. FRECH und M. M. CIOTTI, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 42, 481 (1956). — 148. HURLOCK, B. und P. TALALAY, *J. biol. Chemistry* 233, 886 (1958). — 149. PESCH, L. A. und J. PETERSON, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 96, 390 (1965). — 150. KRAMAR, R., M. MÜLLER und F. SALVENMOSER, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 162, 289 (1968). — 151. MASSEY, V. und C. VEEGER, *Biochim. biophysica Acta*, (Amsterdam) 48, 33 (1961). — 152. KRAMAR, R. und F. SALVENMOSER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 346, 310 (1966). — 153. MAIER, K.-P. und D. PETTE, *Clin. Chim. Acta*, (Amsterdam) 29, 61 (1970). — 154. SHAMRAI, E. F. und A. K. SELEZNEVA, *Vop. Med. Khim.* 15, 512 (1969). — 155. POKROVSKII, A. A., A. I. ARCHAKOV und L. KH. MUKHAMBETOVA, *Tsitologia* 11, 121 (1969). — 156. STACHURA, J., B. PAPLA und M. DUBIEL-BIGAJ, *Acta Med. polon.* 9, 319 (1968). — 157. KRAMAR, R., P. FITSCHA und E. KAISER, in Vorbereitung. — 158. HEINRICH, E.-M., E. KAISER und R. KRAMAR, in Vorbereitung. — 159. GRANICK, S., *Ann. N. Y., Acad. Sci.* 123, 188 (1965). — 160. REMMER, H. und H. J. MERKER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 123, 79 (1965). — 161. PAGLIARO, L., A. NOTARBAROLO, V. MANNINO und G. MIGNECO, *J. Lab. Clin. Med.*, S. Louis 62, 184 (1963). — 162. RYSER, H., J. FREI und A. VANOTTI, *Clin. Chim. Acta*, (Amsterdam) 3, 486 (1958). — 163. SCHERSTÉN, T., P. BJÖRNTORP, S. BJÖRKERUD, S. SMEDS und R. EKHOLM, *Acta hepato-splenol.* 17, 375 (1970). — 164. KAISER, E., R. KRAMAR und E. FARKOUH, unveröffentlichte Versuche. — 165. KRAMAR, R. und E. KAISER, *Toxicon* 6, 145 (1968). — 166. FRENCH, S. W., *Arch. Pathol.*, Chicago 69, 270 (1960).

Dr. R. Kramar
A-1090 Wien
Währinger Str. 10